

XP-002278838

AN - 1995-348317 [45]

AP - JP19940030034 19940228

CPY - KYOW

DC - B04

FS - CPI

IC - A61K38/46

MC - B04-C01 B14-J01A4

M1 - [01] M423 M720 M903 N161 N470 N512 P446 V802 V814

PA - (KYOW) KYOWA HAKKO KOGYO KK

PN - JP7238035 A 19950912 DW199545 A61K38/46 004pp

PR - JP19940030034 19940228

XA - C1995-152872

XIC - A61K-038/46

AB - J07238035 Beta amyloid proteolytic agent contains insulin decomposing enzyme as an effective ingredient.

- USE/ADVANTAGE - The drug is used for prevention and treatment of Alzheimer's disease which is caused due to deposition of beta amyloid. The drug is effective for treatment of Alzheimer's disease by inhibiting accumulation of beta amyloid protein due to lack of beta amyloid decomposing system.

- In an example, rat insulin decomposing enzyme is prepd. by purificn. of rat liver cytosol through 4-step chromatography, diethylaminoethyl-Toyopearl, hydroxyapatite, pentylagarose and TSK G3000SW high-performance liq. chromatography.

- Injection comprises 0.2 mg. rat liver insulin decomposing enzyme. 100 g, D-mannitol and distilled water (in total 2.0 ml.).(Dwg.0/2)

IW - BETA AMYLOID PROTEOLYTIC AGENT CONTAIN INSULIN DECOMPOSE ENZYME EFFECT INGREDIENT TREAT DISEASE

IKW - BETA AMYLOID PROTEOLYTIC AGENT CONTAIN INSULIN DECOMPOSE ENZYME EFFECT INGREDIENT TREAT DISEASE

NC - 001

OPD - 1994-02-28

ORD - 1995-09-12

PAW - (KYOW) KYOWA HAKKO KOGYO KK

TI - Beta amyloid proteolytic agent - contg. insulin decomposing enzyme as effective ingredient for treating Alzheimer's disease

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-238035

(43)公開日 平成7年(1995)9月12日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/46	ADD			
	AAM			
	AED			

A 6 1 K 37/ 54

ADD

AAM

審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全 4 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-30034

(22)出願日 平成6年(1994)2月28日

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 後藤 佐多良

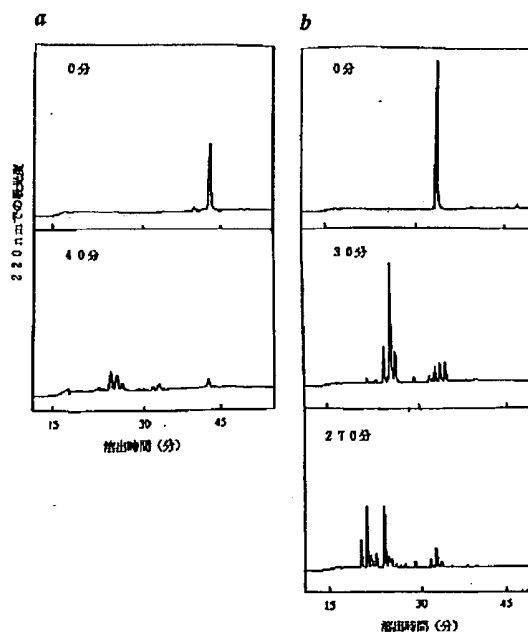
東京都千代田区四番町8-3

(54)【発明の名称】 β アミロイド蛋白質分解剤

(57)【要約】

【目的】 アルツハイマー病などの β アミロイド蛋白質(β A)の沈着によって引き起こされる疾患の治療および予防に有用な β A分解剤を提供する。

【構成】 インスリン分解酵素を有効成分とする β アミロイド蛋白質分解剤。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 インスリン分解酵素を有効成分とするβアミロイド蛋白質分解剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アルツハイマー病などのβアミロイド蛋白質（以下、βAという）の沈着によって引き起こされる疾患の治療および予防に有用なβA分解剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 βAは、アルツハイマー病などのある種の神経疾患患者の脳の神経細胞あるいは血管に沈着し痴呆などの症状を引き起こす原因物質とされている。βAは、膜貫通前駆体蛋白質（βAPP）に由来する39～43アミノ酸からなり、βAPPの細胞質での正常な代謝過程で生じると言われている。アルツハイマー病患者の脳におけるβAの蓄積はβA分解系の欠陥に起因すると考えられる。従って、βA分解に関与する物質はアルツハイマー病などのβAの沈着によって引き起こされる疾患の治療および予防に有用であると考えられる。従来、βAを除去する方法あるいはβAの蓄積を防止する方法は知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、アルツハイマー病などのβAの沈着によって引き起こされる疾患の治療および予防に有用なβA分解剤を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、インスリン分解酵素を有効成分とするβA分解剤に関する。インスリン分解酵素は、例えば国際酵素委員会分類番号EC3.4.2.2.11で表される酵素であり、ラット肝臓、ヒト赤血球、ヒト胎盤などから精製するかあるいは該当cDNA [Science, 242, 1415(1988)] を微生物、植物細胞あるいは動物細胞で発現させた後単離精製することにより得られる。

【0005】 ヒト赤血球インスリン分解酵素は、Science, 242, 1415(1988)に記載の方法により、ヒト胎盤インスリン分解酵素は、Biochem. Biophys. Res. Comm., 181, 1398(1991)に記載の方法により得ることができる。また、ラット肝臓インスリン分解酵素は、後述する試験例1に記載の方法により得ることができる。また、cDNAを発現させる方法としては、例えば、あらかじめ末端に数残基のヒスチジンをコードする塩基配列をつないだヒトインスリン分解酵素cDNA [Science, 242, 1415(1988)] をカイコ核多角体病ウイルス（BmNPV）のポリヘドリン遺伝子のプロモーターを有するベクターpBK283につなぎ、BmNPV DNAと共にカイコ細胞（BmN4）に共感染させる。感染細胞の中から相同組換えを起こした組換え体ウイルスをクローニング

し、これをカイコガ幼虫に感染させヒトインスリン分解酵素を産生させる。これを亜鉛アフィニティーカラムクロマトグラフィーに付し、ヒトインスリン分解酵素を精製する。

【0006】 次に、インスリン分解酵素の薬理作用について試験例で説明する。

試験例1 βA分解作用

ラット肝臓の細胞質分画を4段階のクロマトグラフィー [ジエチルアミノエチルオートヨパール（登録商標、東ソー社）、ヒドロキシルアパタイト、ベンチルアガロース、TSK G3000SW高速液体クロマトグラフィー（東ソー社）] に付すことによりインスリン分解酵素を精製した。この精製酵素0.2μgおよびβA₁₋₄₀（Bachem California社）5μgあるいはβA₁₋₂₈（βA₁₋₄₀の1～28残基に相当、Bachem California社）11μgを、50mM Tris-HCl緩衝液（pH7.0）70μl中37℃でインキュベートした。経時的にサンプルを採取し、これに0.06%トリフルオロ酢酸水溶液0.7mlを加え反応を停止した。反応液をRP-318逆相カラムクロマトグラフィー（Bio Rad社；粒径5μm、250×4.6mm；0～80%アセトニトリル-0.06%トリフルオロ酢酸水溶液直線濃度勾配；流速0.5ml/分）に付し、溶出液の220nmでの吸光度を測定した。その結果を第1図に示す。

【0007】

【図1】 第1図から明らかなように、インスリン分解酵素はβAをほぼ完全に小断片に分解した。

【0008】 試験例2 インスリン分解酵素-¹²⁵I-βA架橋試験

組織ホモジネートを遠心分離（100,000×g、60分）して得られたラット脳あるいはラット肝臓の細胞質分画50μgおよび¹²⁵I-βA₁₋₂₈ [βA₁₋₂₈を、Na¹²⁵I（Amersham社）を用いクロロミンT法 [Biochem. J., 164, 607(1977)] によりラベル化し、逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製] を、2mM 1,10-フェナンスロリンおよび5mM エチレンジアミン四酢酸存在下、150mM 塩化ナトリウム含有20mM リン酸緩衝液（pH7.4）中（計50μl）、24℃でインキュベートした。10分後、架橋剤ジサクシニミジルスベレート（1mM/25%ジメチルスルホキシド）3μlを加え、さらに15分間同温度で反応させ、これに5%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）および25%2-メルカプトエタノールを含む緩衝液14μlを加え、反応を停止した。100℃で3分間加熱後、生成物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付し、乾燥後、イメージングプレートに露光しBAS2000（富士フィルム社）で解析した。その結果を第2図に示す。

【0009】

【図2】第2図から明らかなように、 $^{125}\text{I}-\beta\text{A}_{1-28}$ は分子量110,000の蛋白質と特異的に結合した(lane 1, 脳; lane 5, 肝臓)。さらに、分子量110,000の蛋白質との架橋反応は過剰量の非標識 βA_{1-28} の添加により阻害され(lane 2)、また非標識 βA_{1-40} (lane 3)あるいはインスリン(lane 4)の添加によっても阻害された。

【0010】以上の事実は、細胞内蛋白質分解酵素の中で βA 分解作用を有するものがインスリン分解酵素のみであることを示す。インスリン分解酵素は、そのままあるいは各種の製薬形態で使用することができる。本発明の製薬組成物は、活性成分として、有効な量のインスリン分解酵素を薬理的に許容される担体と均一に混合して製造できる。これらの製薬組成物は、注射による投与に対して適する単位服用形態にあることが望ましい。

【0011】注射剤は、蒸留水、塩溶液、グルコース溶液または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製することができる。この際、常法に従い、適当な溶解補助剤または懸濁剤を用いて、溶液、懸濁液または分散液として調製される。また、当該液剤を凍結乾燥し、凍結乾燥剤として調製することもできる。凍結乾燥の条件は特に限定しないが、通常は、 -50°C 以下で1~5時間凍結し、棚温 $-20\sim 0^{\circ}\text{C}$ 、真空度 $50\sim 150\text{mTorr}$ で24~48時間乾燥し、次いで棚温 $1\sim$

処方	ヒト赤血球インスリン分解酵素	0.2 mg
	D-マンニトール	100 mg
	注射用蒸留水	適量
		2.0 ml

【0016】実施例2 注射剤
常法により次の組成からなる注射剤を作成する。ヒト胎盤から精製したインスリン分解酵素[Biochem. Biophys. Res. Comm., 181, 1398(1991)] 0.125mg/mlを注射用蒸留水80mlに溶解し、これにD-マンニトール5.0gを加え、注射用蒸留水で容量を100ml※

処方	ヒト胎盤インスリン分解酵素	0.2 mg
	D-マンニトール	100 mg
	注射用蒸留水	適量
		2.0 ml

【0018】実施例3 注射剤
常法により次の組成からなる注射剤を作成する。ラット肝臓から精製したインスリン分解酵素(試験例1参照) 0.125mg/mlを注射用蒸留水80mlに溶解し、これにD-マンニトール5.0gを加え、注射用蒸留水で容量を100mlにあわせる。得られた溶液を★

処方	ラット肝臓インスリン分解酵素	0.2 mg
	D-マンニトール	100 mg
	注射用蒸留水	適量
		2.0 ml

【0020】実施例4 注射剤

* $0\sim 30^{\circ}\text{C}$ 、真空度 $50\sim 100\text{mTorr}$ で16~24時間乾燥し、凍結乾燥品を得る。

【0012】なお、本発明の βA 分解剤は、通常各種製薬担体、賦形剤、希釈剤、安定化剤あるいは吸着防止剤などを含むことができる。インスリン分解酵素は、上記製薬形態で注射剤として投与することができ、その有効容量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、症状などにより異なるが、通常成人一人当たり $1.5\mu\text{g}\sim 15\text{mg}$ 、好ましくは $15\mu\text{g}\sim 5\text{mg}$ を1週間当たり1~7回投与する。投与方法としては、静脈注射、皮下注射、筋肉内注射、脳内投与などが用いられる。

【0013】以下に、実施例を示す。

【0014】

【実施例】

実施例1 注射剤

常法により次の組成からなる注射剤を作成する。ヒト赤血球から精製したインスリン分解酵素[Science, 242, 1415(1988)] 0.125mg/mlを注射用蒸留水80mlに溶解し、これにD-マンニトール5.0gを加え、注射用蒸留水で容量を100mlにあわせる。得られた溶液を $0.22\mu\text{m}$ のディスポーザブル製メンブレンフィルターを用いて無菌濾過後、ガラスバイアルに2mlずつ無菌的に充填し、注射剤(1バイアルあたり活性成分0.2mgを含有する)を得る。

【0015】

	0.2 mg
	100 mg
	適量
	2.0 ml

30※1にあわせる。得られた溶液を $0.22\mu\text{m}$ のディスポーザブル製メンブレンフィルターを用いて無菌濾過後、ガラスバイアルに2mlずつ無菌的に充填し、注射剤(1バイアルあたり活性成分0.2mgを含有する)を得る。

【0017】

40★ $0.22\mu\text{m}$ のディスポーザブル製メンブレンフィルターを用いて無菌濾過後、ガラスバイアルに2mlずつ無菌的に充填し、注射剤(1バイアルあたり活性成分0.2mgを含有する)を得る。

【0019】

50 常法により次の組成からなる注射剤を作成する。ラット

5

肝臓から精製したインスリン分解酵素（試験例1参照）
 0.625 mg/ml を注射用蒸留水 80 ml に溶解し、これにD-マンニトール 5.0 g を加え、注射用蒸留水で容量を 100 ml にあわせる。得られた溶液を 0.22 μm のディスポーザブル製メンブランフィルタ*

処方	ラット肝臓インスリン分解酵素	1.0 mg
	D-マンニトール	100 mg
	注射用蒸留水	適量
		2.0 ml

【0022】

【発明の効果】本発明により、アルツハイマー病などのβAの沈着によって引き起こされる疾患の治療および予防に有用なβA分解剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】インスリン分解酵素によるβA分解の経時変化を追った高速液体クロマトグラムである。

【図2】インスリン分解酵素-¹²⁵I-βA架橋試験の結果を電気泳動で解析した図である。

【符号の説明】

6

*一を用いて無菌濾過後、ガラスバイアルに2mlずつ無菌的に充填し、注射剤（1バイアルあたり活性成分1.0 mgを含有する）を得る。

【0021】

10 a: βA₁₋₄₀を使用したときの結果b: βA₁₋₂₈を使用したときの結果

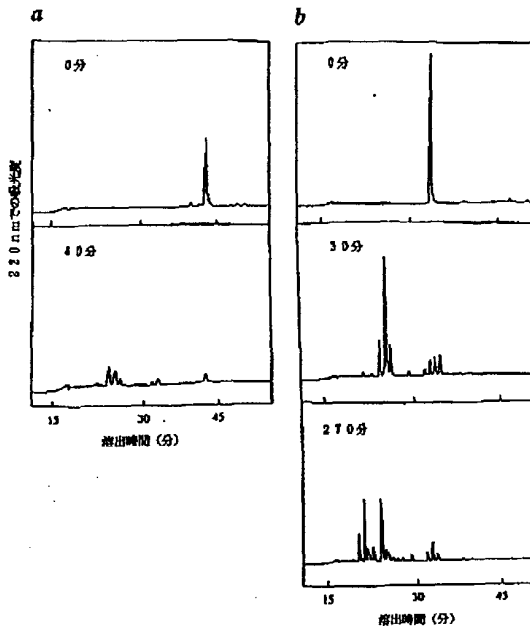
1: ラット脳細胞質分画を使用したときの結果

2: ラット脳細胞質分画を使用し、過剰量の非標識βA₁₋₂₈を添加したときの結果3: ラット脳細胞質分画を使用し、非標識βA₁₋₄₀を添加したときの結果

4: ラット脳細胞質分画を使用し、インスリンを添加したときの結果

5: ラット肝臓細胞質分画を使用したときの結果

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

A61K 37/54

AED